

リポタンパク質 詳細解析サービス



株式会社免疫生物研究所

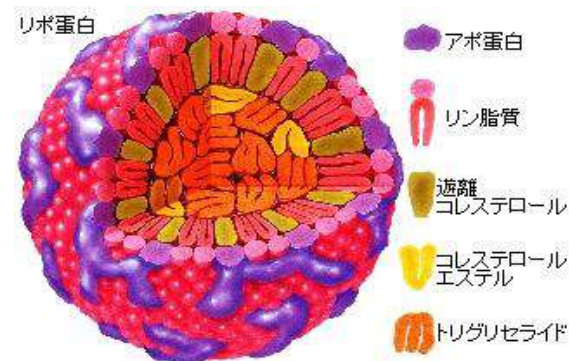
- ・微量の血液サンプルから、リポタンパク質の詳細プロファイルデータを分析する受託サービス
- ・具体的には、ゲルろ過HPLC法により、
 - リポタンパク質の主要4分画（CM、VLDL、LDL、HDL）と
 - 詳細20分画（粒子サイズで分類したサブクラス）に含まれるコレステロールと中性脂肪の量を同時に定量分析する受託サービス

LipoSEARCH®の特徴

- 微量の血清・血漿で分析可能（ヒト45μl、動物35μl）
- 主要分画のうち従来は分析が困難だったCM、VLDLも定量評価可能
- 動脈硬化リスクマーカー「小型LDL」等の詳細20分画の分析が可能
- リポタンパク質「粒子サイズ」「粒子数」の分析が可能
- ヒト、マウス、ウサギ、サルなど動物種を問わず分析可能
- 血液の他、培養上清や脳脊髄液などの低濃度サンプルも分析可能
- 国内外顧客の論文へのデータ引用は550報を超える実績（2023年時点）
- 新薬の非臨床試験、臨床開発試験（Phase II、III）、トクホ試験への採択実績多数
- データ解析アルゴリズムは国内外の特許を取得済み

リポタンパク質とは？

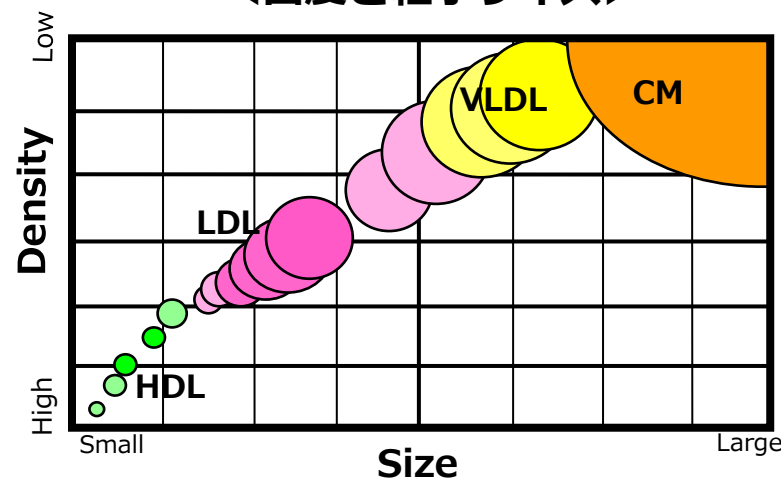
リポタンパク質とは、**コレステロール・中性脂肪**等の脂質を、**吸収・合成部位から抹消の使用部位へ**運搬し回収するための、**複合体粒子**のこと



■ リポタンパク質の種類と特徴

主要分画	脂質成分	合成・代謝
カイロミクロン CM	中性脂肪が約80~90%、 残りはコレステロールや リン脂質	食事の脂質から小腸で合成されリン 管から血液に入り、肝臓に運ばれる。
超低比重 リポタンパク VLDL	中性脂肪が約55%、コレ ステロールやリン脂質が それぞれ約20%	食事の脂質と炭水化物から肝臓で合 成され血液中に分泌される。 中性脂肪が分解され引き抜かれるに したがってコレステロールが次第に増加 する代謝により、LDLへと変わる。
低比重 リポタンパク LDL	コレステロールが約45%、 中性脂肪やリン脂質がそ れぞれ約20%	VLDLが代謝されLDLとなり、末梢組織 へコレステロールを配る。これが過剰 になると動脈硬化を引き起こすので 「悪玉コレステロール」と言われる。
高比重 リポタンパク HDL	リン脂質が約50%と多く、 コレステロールが約30%、 中性脂肪が約3%	主に肝臓と小腸で合成され、細胞や血 管のコレステロールを肝臓に回収する ので「善玉コレステロール」と言われ る。

<密度と粒子サイズ>



(Advances in Protein Chemistry Vol.45 , 303, 1990)

**リポタンパク質プロファイリングは
脂質代謝研究に必須の情報**

1. 総コレステロール、中性脂肪 データ

単位 : mg/dl

	Total
Cho	237.93
TG	84.13

2. 主要4分画 データ

Class	CM (>80nm)	VLDL (30-80nm)	LDL (16-30nm)	HDL (8-16nm)
Cho	0.05	21.36	138.21	78.31
TG	0.33	46.47	24.05	13.28

3. 詳細20分画 データ

Peak No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Particle Diameter (nm)	>90	75	64	53.6	44.5	36.8	31.3	28.6	25.5	23	20.7	18.6	16.7	15	13.5	12.1	10.9	9.8	8.8	7.6
Sub-Class			large VLDL			medium VLDL	small VLDL	large LDL	medium LDL	small LDL	very small LDL			very large HDL		large HDL	medium HDL	small HDL	very small HDL	
Cho	0.05	0.00	0.00	0.41	2.45	6.61	11.89	38.11	52.94	31.36	10.54	4.00	1.27	1.66	2.56	19.77	26.57	16.59	6.95	4.20
TG	0.18	0.15	0.46	5.30	15.48	15.88	9.35	9.70	7.98	4.02	1.50	0.61	0.23	0.31	0.23	3.10	4.61	2.67	1.04	1.32

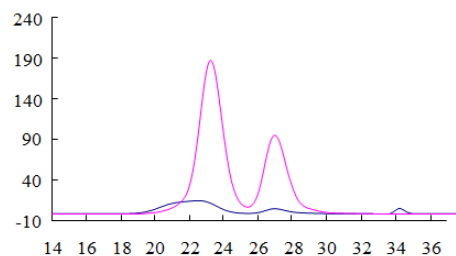
4. クロマトグラム データ

5. オプション項目

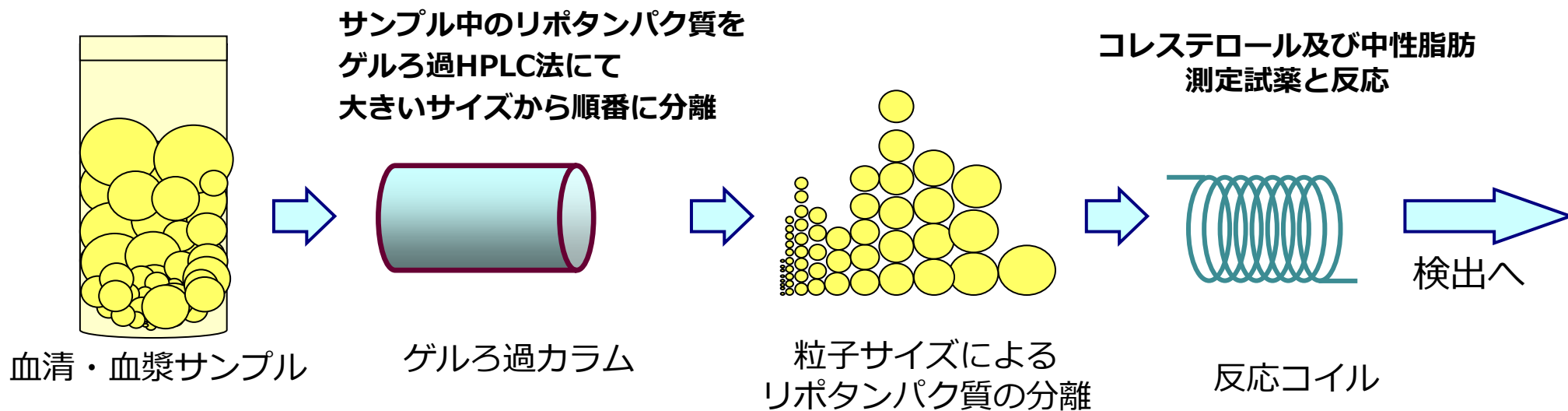
従来の脂質データ指標は、「Total-Cho」「HDL-Cho」「LDL-Cho」「Total-TG」のみ

LipoSEARCH® は、リポタンパク質詳細分画まで含む脂質のトータル・プロファイルデータを提供します

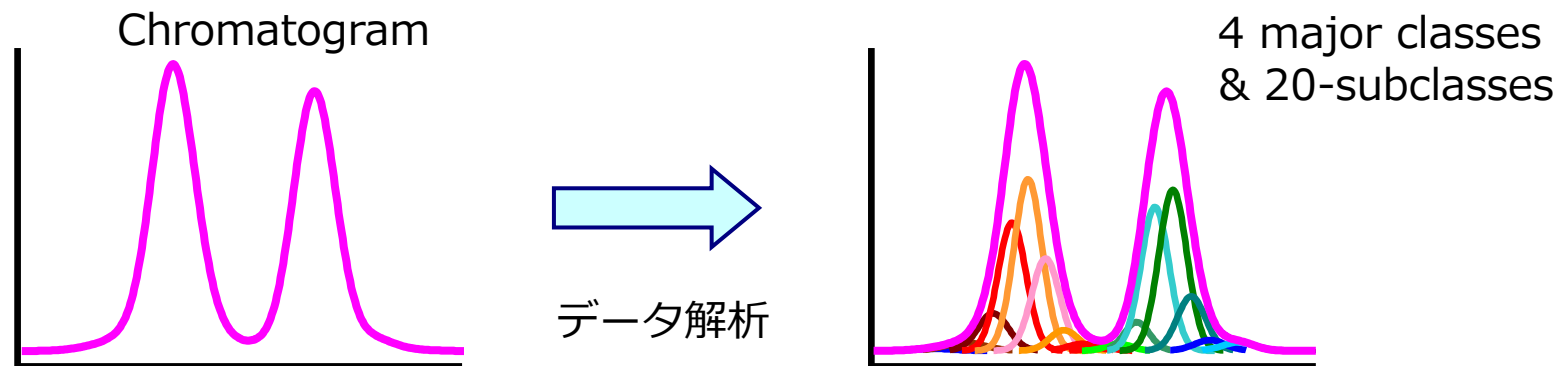
- ・ **リポタンパク質**
- ・ **粒子サイズ**
- ・ **粒子数**
- ・ 遊離グリセロール
- ・ 遊離コレステロール & リン脂質



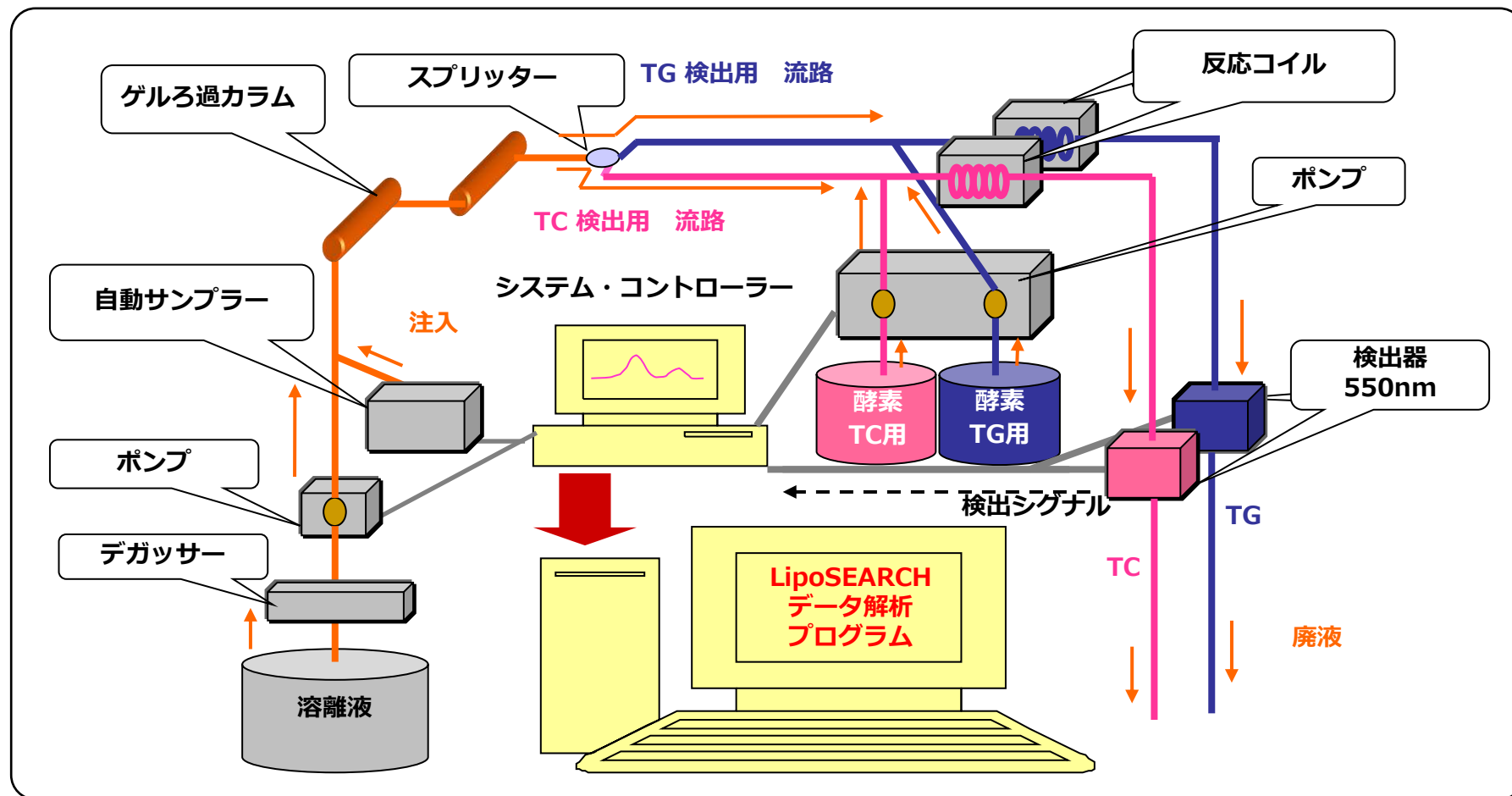
Step 1: サンプル測定 ～リポタンパク質の分離と酵素反応～



Step 2: データ解析 ～主要分画・詳細分画定量～

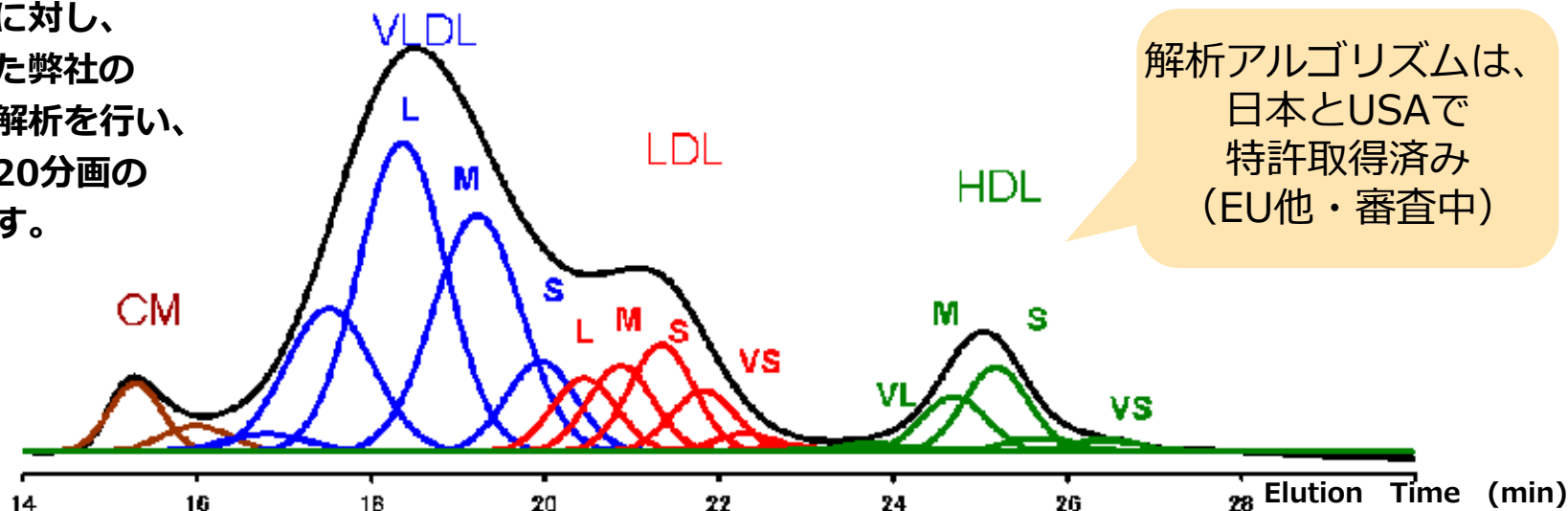


測定方法：ゲルろ過HPLC法



東京医科歯科大学の研究成果である解析技術の独占ライセンスを受け事業化
解析技術は日米欧にて特許成立

ゲルろ過HPLC法により測定した
クロマトグラムデータに対し、
ガウス近似法を応用した弊社の
アルゴリズムでデータ解析を行い、
リポタンパク質の詳細20分画の
数値データを算出します。

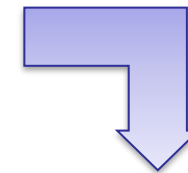


Major Class	CM >80 nm		VLDL: 30 - 80 nm					LDL: 16 - 30 nm						HDL: 8 - 16 nm						
Component peak No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Particle Diameter (nm)	>90	75	64	53.6	44.5	36.8	31.3	28.6	25.5	23.0	20.7	18.6	16.7	15.0	13.5	12.1	10.9	9.8	8.8	7.6
Subclass	CM		L			M	S	L	M	S	VS			VL	L	M	S	VS		

VL, very large; L, large; M, medium; S, small; VS, very small

従来のリポタンパク質分析方法との比較

測定方法	ゲルろ過HPLC法 (LipoSEARCH)	超遠心分離法	電気泳動法	直接法	NMR法
測定原理	粒子サイズ	比重	電荷	酵素反応	共鳴シグナル
必要検体量	0.01ml	0.7ml	0.05ml	1ml	0.6ml
測定時間	25分	270分以上	30分	10分	1分
主要分画測定	○	○	○	△	○
CM	○	○	×	×	?
VLDL	○	○	△	×	?
LDL	○	○	△	△	○
HDL	○	○	△	○	○
詳細分画測定	○	△	△	×	○
VLDL subclass	○	△	?	×	?
LDL subclass	○	△	△	△	○
HDL subclass	○	△	△	×	?
Particle Size	○	×	△	×	?
Particle number	○ New !!	×	×	×	○
Fractionation	○	○	×	×	×
再現性	○	×	×	○	△
定量性	○	×	×	○	△
コスト	△	×	△	○	△
特徴・メリット	必要検体が微量で済む 測定原理が明瞭 詳細分画を含むTotal Profile データを取得可能 粒子サイズを分析可能	脂質分析の ゴールドン・スタンダード	主要分画の定性分析に 利点	簡便、安価	詳細分画の分析が可能 粒子数を分析可能
課題	多数検体測定のスループット	多大な労力が必要 検体量が多く必要	定量分析に不向き ゲルのロット間差の問題	詳細分画測定に不向き 試薬メーカー間誤差(特にLDL)	分析・データ算出が複雑 で多くの仮定に基づく 測定機器が高価



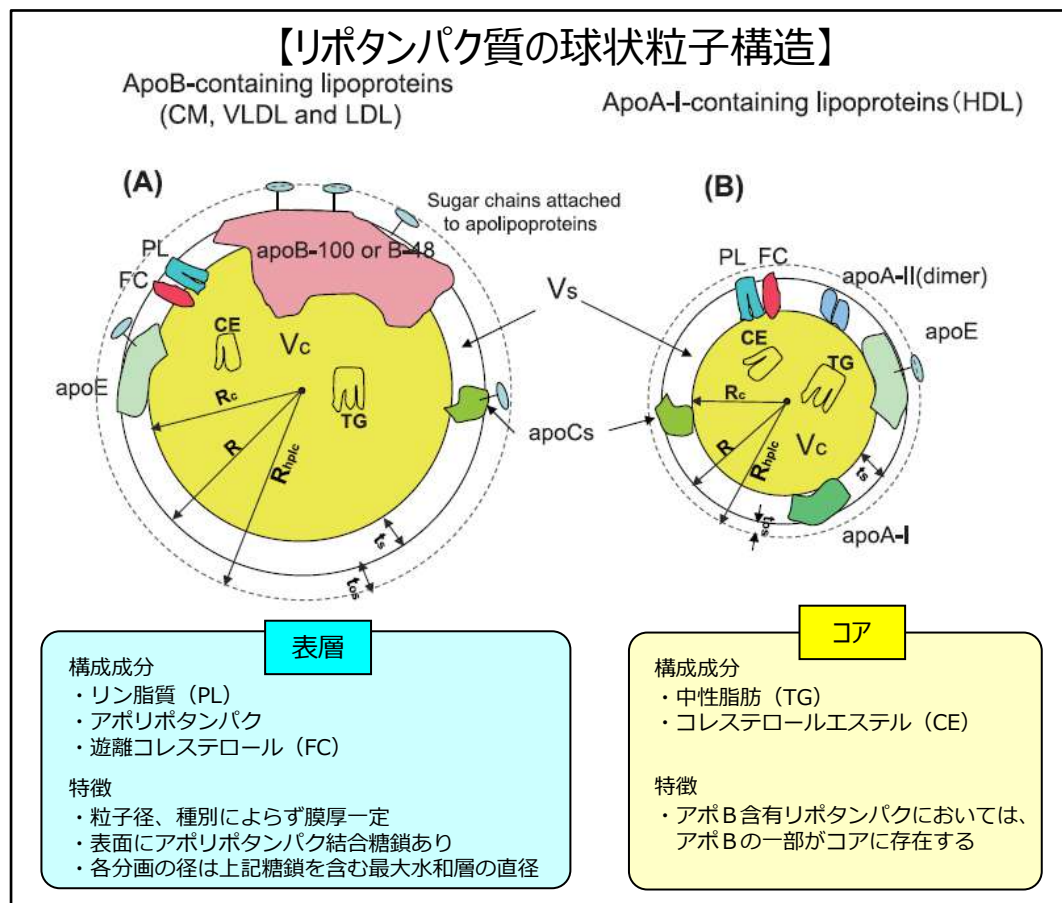
**LipoSEARCH は
他手法の課題を
解決した、
画期的な
リポタンパク質
解析方法です！**

- ・近年の研究により、血中のリポタンパク質「粒子数」が、心臓疾患のリスクを把握できる因子として、従来指標より優れていることが示され、注目されています。
- ・リポタンパク質の球状粒子構造に着目し、LipoSEARCH解析データに新開発したアルゴリズムを適用し、分画ごとのリポタンパク質粒子数 (nM) を算出します。
- ・過去にLipoSEARCH(20分画)の解析を行ったことがある場合は、その結果から粒子数データを算出可能です。

■ 粒子数解析の原理：

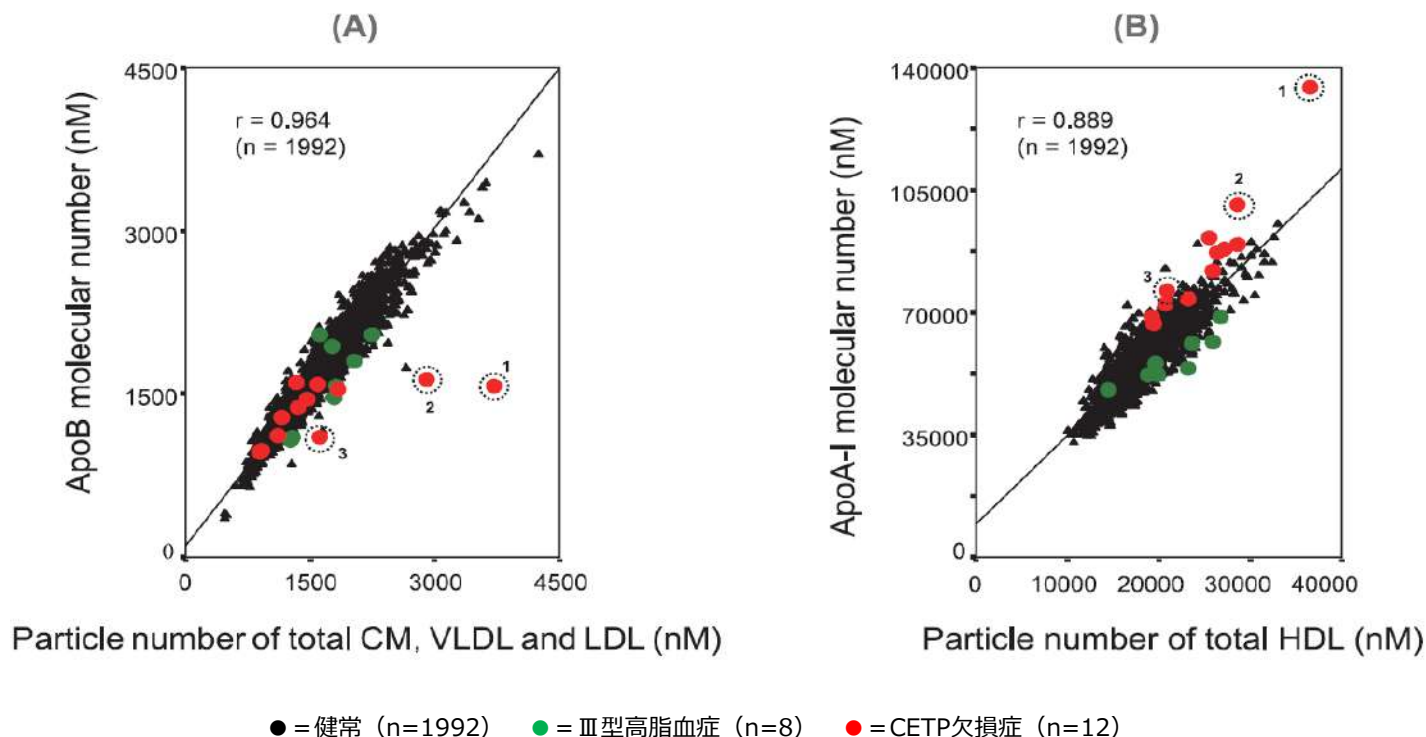
各分画の粒子数 =
コア脂質構成成分体積 V_c ÷ 1粒子あたり体積理論値 V_{ref}

$V_c = V_{tg} + V_{ce}$ * V_{ce} は、LipoSEARCHのChoとTG値より算出可能
 $V_{ref} = \frac{4}{3}\pi r^3$: rはLipoSEARCH定義の各分画粒子の半径



■ 解析アルゴリズムの検証：アポリポ蛋白と粒子数の関連性

- apoBはカイロミクロン、VLDL、LDLのPN(=粒子数)の和と強い相関を示した ($r=0.964$, $p<0.001$)
- apoA1とHDL-PNの間でも強い相関がみられた ($r=0.889$, $p<0.001$)



**LipoSEARCH® は、心疾患のリスクを反映すると言われていて、
リポタンパク質「粒子数」(LDL粒子数、HDL粒子数)のデータを定量可能です。**

○Lipoprotein-subclass particle numbers in children with abdominal obesity

Hiroki Akiyama et al

[Pediatr Int. 2022 Jan;64\(1\):e15045.](#)

→ 日本人腹部肥満児164名を対象にリポタンパク質粒子数について詳細解析

○The mechanism of increased intestinal palmitic acid absorption and its impact on hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis

Masakazu Hanayama et al

[Sci Rep. 2021 Jun 28;11\(1\):13380.](#)

→ NASHモデルラットを用いてCMを介した肝臓パルミチン酸の急激な増加と肝線維化の関係検討
高脂肪食を負荷したNASHモデルラットでは血中CM粒子数が多いことを示す

○Distinct Differences in Lipoprotein Particle Number Evaluation between GP-HPLC and NMR: Analysis in Dyslipidemic Patients Administered a Selective PPAR α Modulator, Pemafibrate

Shizuya Yamashita et al

[J Atheroscler Thromb. 2021 Sep 1;28\(9\):974-996.](#)

→ 脂質異常症患者212名を対象としたPⅡ臨床試験におけるペマフィブラートのリポタンパク質粒子数に対する効果を検討

○VLDL-specific increases of fatty acids in autism spectrum disorder correlate with social interaction

Noriyoshi Usui et al

[EBioMedicine. 2020 Aug;58:102917.](#)

→ 自閉症スペクトラム症児童における脂質代謝の特徴（VLDLおよびApoBの特異的な減少など）について検討

Evolocumab Effects on Lipoproteins, Measured by High-Performance Liquid Chromatography

Daisaku Masuda et al

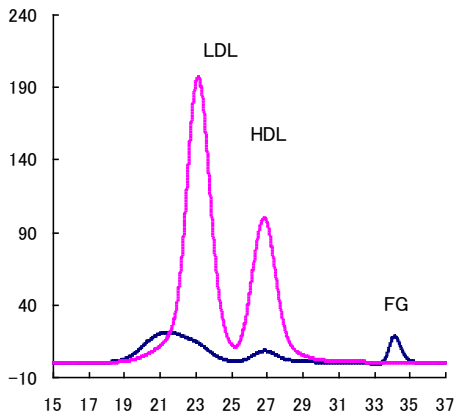
[J Atheroscler Thromb. 2020 Nov 1;27\(11\):1183-1207.](#)

→ PⅢ臨床試験（YUKAWA-2）におけるPCSK9阻害薬エボロクマブのリポタンパク質サブクラスを解析
特に粒子数と粒子サイズに対する効果を検討

解析事例：様々な動物種波形

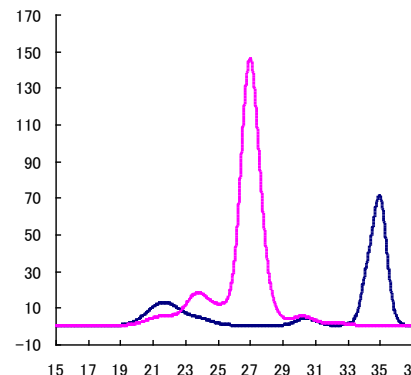
* 弊社データ (数値単位: mg/dL)

【ヒト 健常】



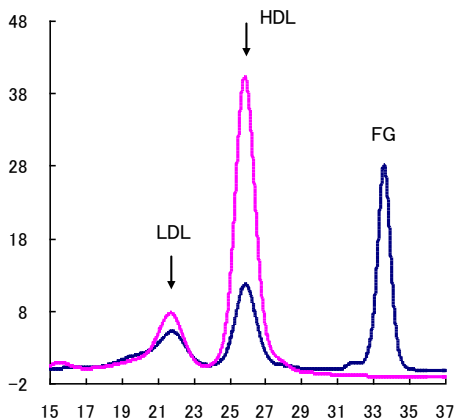
主要分画	数値
T-Cho	166.16
CM-Cho	0.00
VLDL-Cho	21.48
LDL-Cho	89.30
HDL-Cho	55.38
TG	73.10

【マウス wild type】



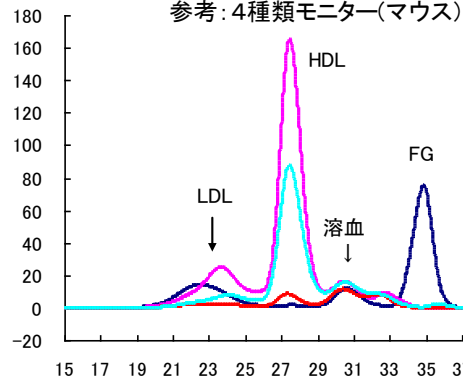
主要分画	数値
T-Cho	99.64
CM-Cho	0.02
VLDL-Cho	6.54
LDL-Cho	10.89
HDL-Cho	82.19
TG	40.10

【ウサギ JW】



主要分画	数値
T-Cho	18.42
CM-Cho	0.05
VLDL-Cho	1.64
LDL-Cho	2.26
HDL-Cho	14.47
TG	20.35

参考: 4種類モニター(マウス)



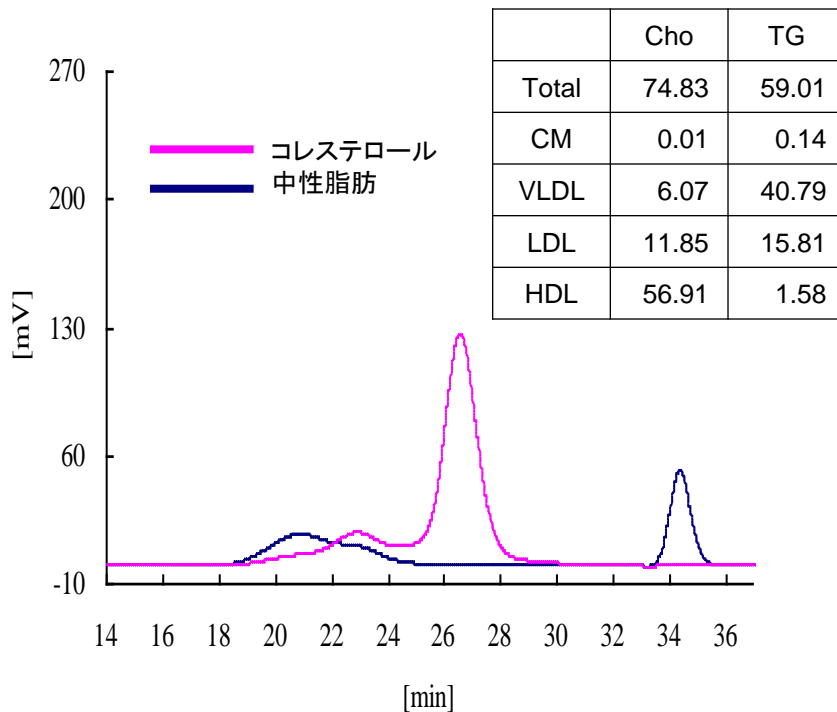
コレステロールと中性脂肪の他に
リン脂質とフリーコレステロール
の測定事例です。

- コレステロール
- 中性脂肪
- リン脂質
- フリー・コレステロール

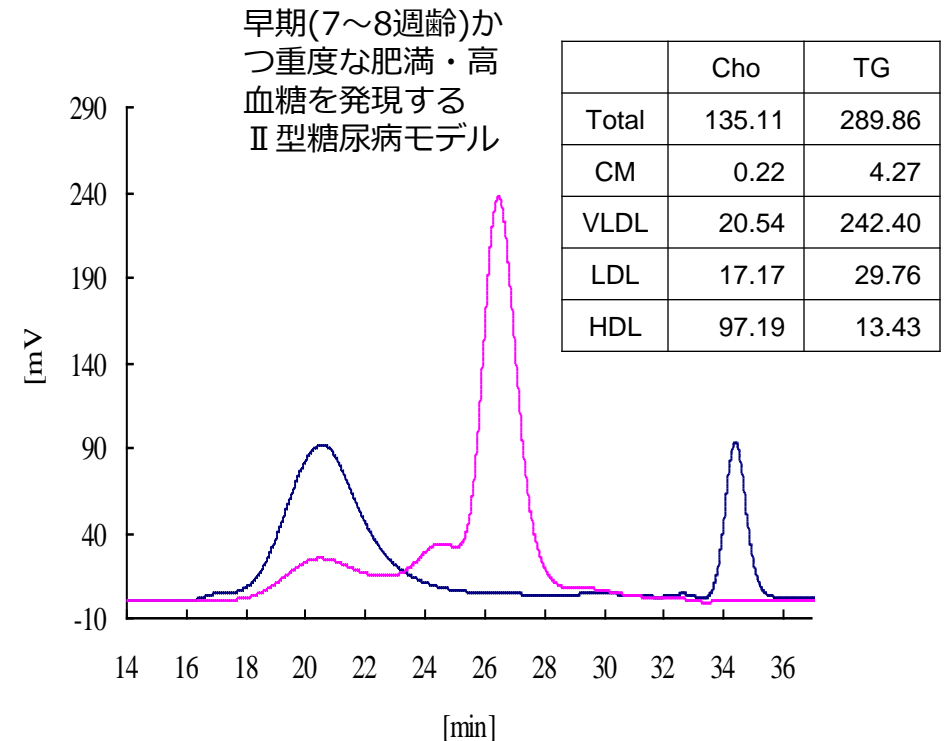
ヒト・マウス・ラット・ウサギ・イヌ・ネコ・サル、トリ・メダカ等で測定実績があり、
動物種を問わず、少量検体で脂質代謝の研究データを取得可能です。

* 弊社データ (数値単位:mg/dL)

C57BL/6, 8週齢♂

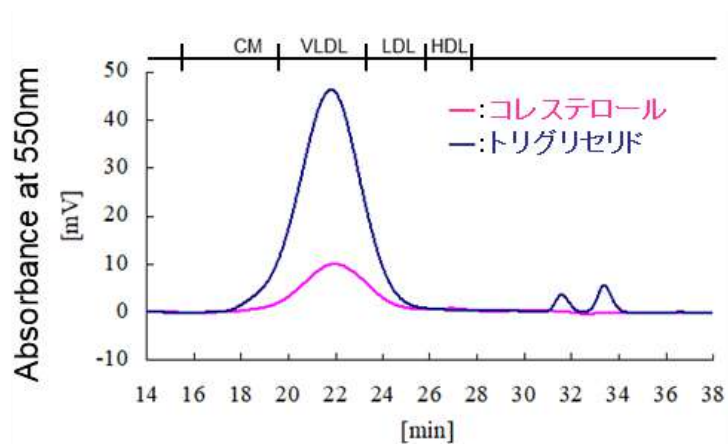
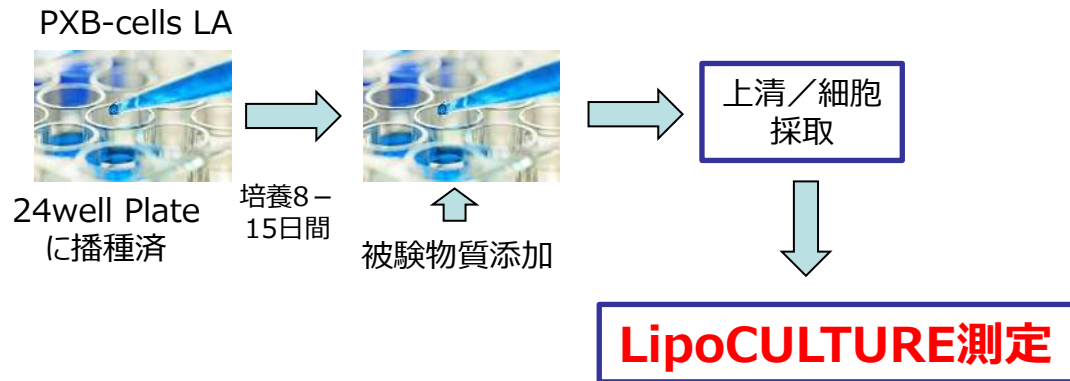
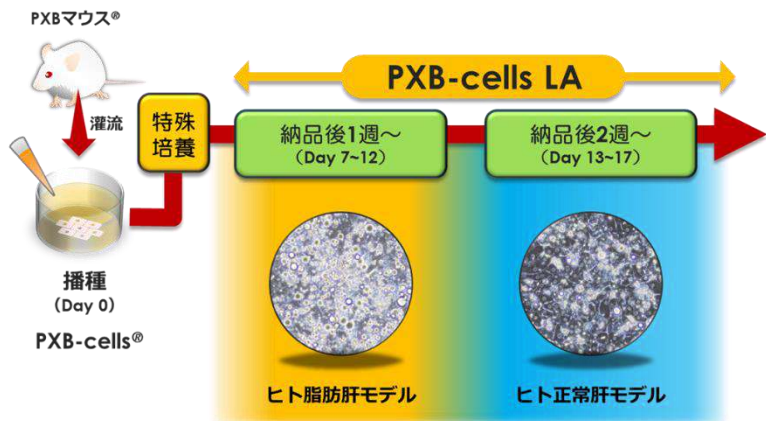


KK-A^y, 9週齢♂

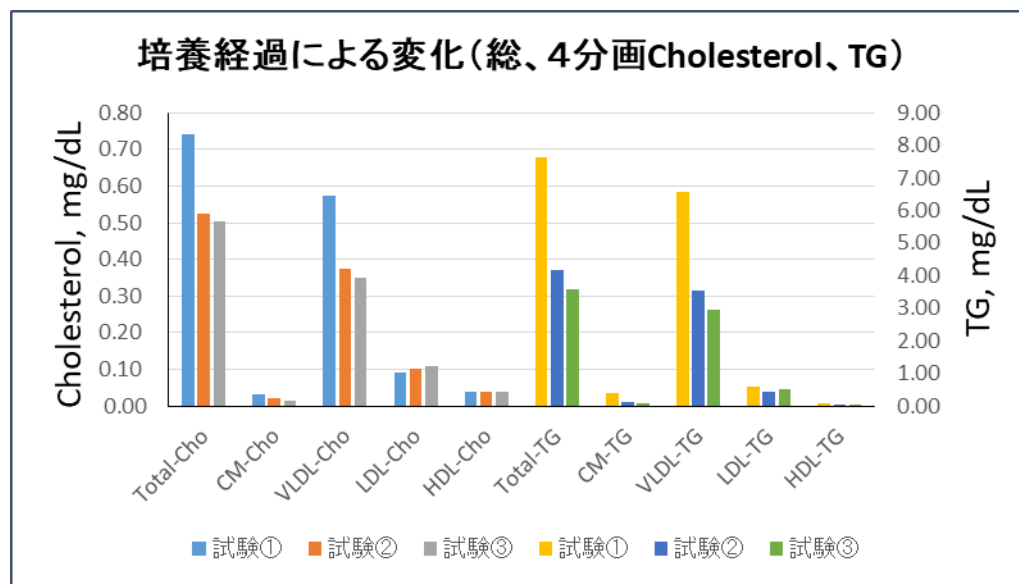


病態の相違や経時変化を、クロマトグラムで視覚的に
数値データで定量的に捉えることが可能

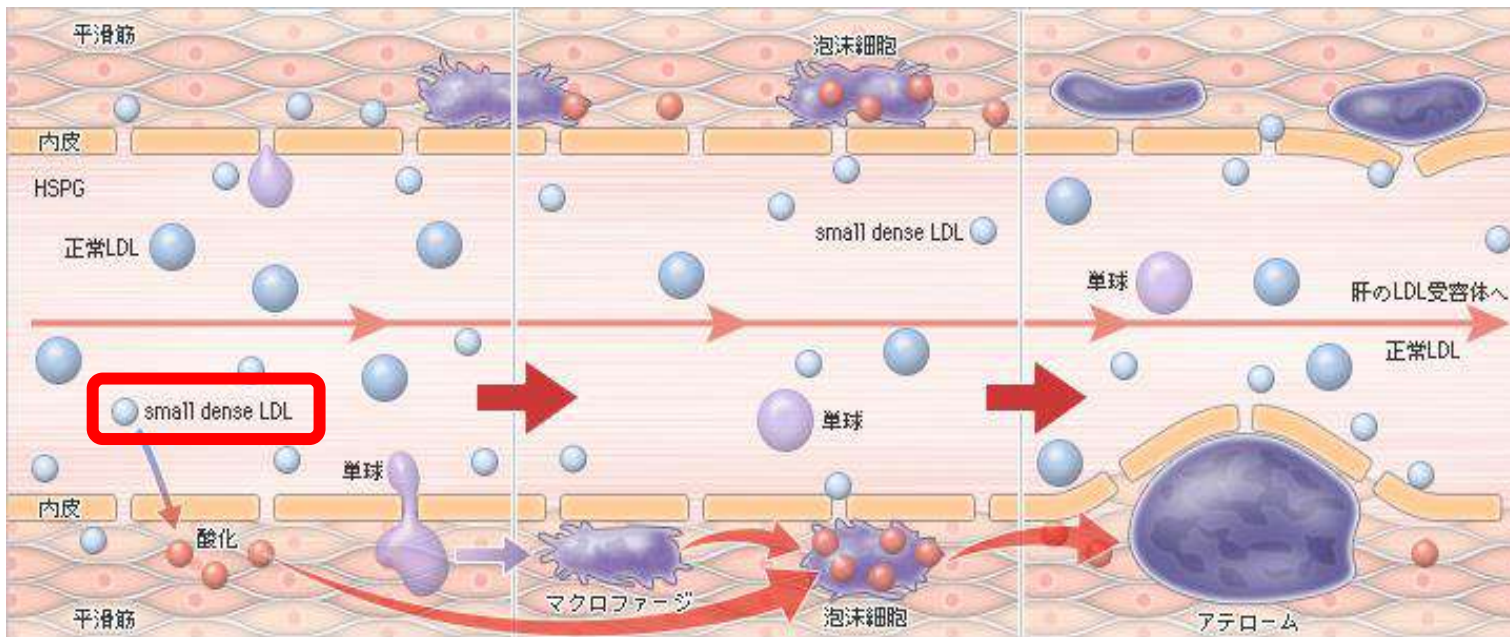
解析事例：細胞培養上清測定事例



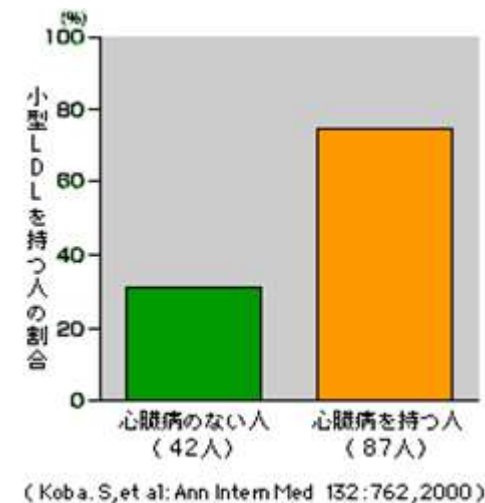
in vitro段階から詳細な
脂質プロファイルの検討可能



【小型LDLが動脈硬化を引き起こすメカニズム】



【心疾患の有無とLDLのサイズ】



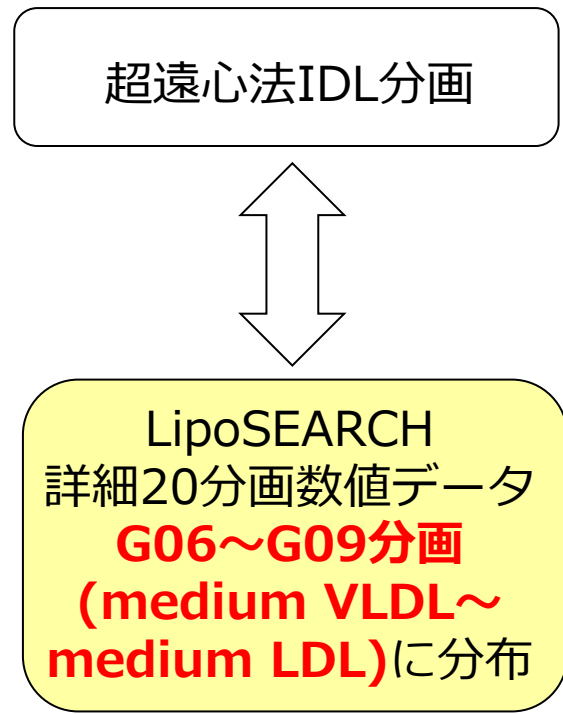
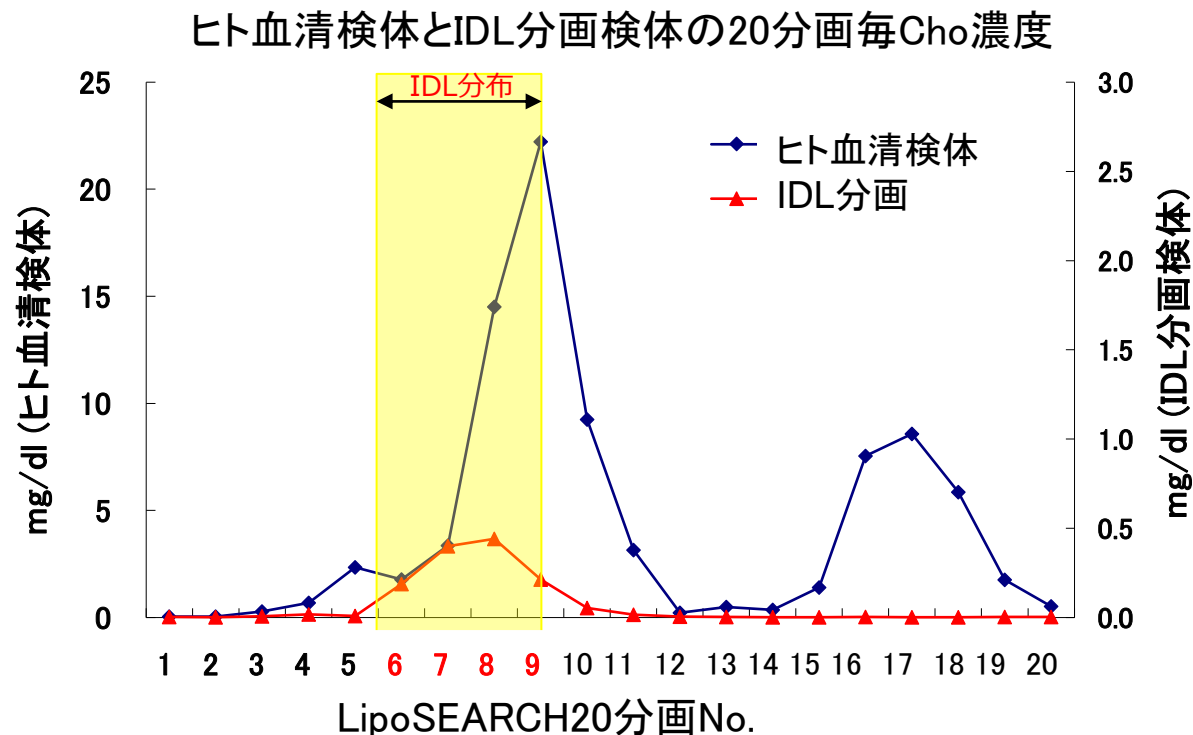
血中のLDLコレステロールは、増え過ぎると動脈硬化を引き起こすことから「悪玉コレステロール」と呼ばれ、生活習慣病のリスク・マーカーとして健康診断で検査されています。

近年の研究により、LDLの中でも粒子サイズが小さい「小型LDL」(small, dense LDL)というリポタンパク質が、特に動脈硬化を促進することが明らかとなりました。小型LDLに含まれるコレステロールは「超悪玉コレステロール」と呼ばれ、注目されています。

これからの生活習慣病の予防・早期発見・治療には、リポタンパク質の粒子サイズやリポタンパク質サブクラスの測定が重要と言われております。

LipoSEARCH® は、生活習慣病のリスクマーカーである小型LDL等、リポタンパク質詳細分画のデータを定量可能です。

ヒト血清検体と超遠心法にて分取したIDL分画検体をそれぞれLipoSEARCH測定



LipoSEARCHは他の測定手法による亜分画の分布も評価出来ます。

心疾患（CAD）の有無による脂質プロファイル比較

Subclasses	CAD (n=45)			non CAD (n=17)			
	mean	±	SD	mean	±	SD	
large VLDL	4.3	±	3.6	4.0	±	4.0	
medium VLDL	11.1	±	6.0	9.6	±	5.9	
small VLDL	12.5	±	3.8	8.7	±	3.5	***
large LDL	34.0	±	10.9	29.7	±	8.3	
medium LDL	48.9	±	12.0	42.6	±	9.9	
small LDL	28.6	±	9.7	23.4	±	6.2	*
very small LDL	10.2	±	3.9	7.5	±	1.8	***
very large HDL	2.7	±	1.3	3.1	±	1.5	
large HDL	8.4	±	5.2	14.6	±	8.3	***
medium HDL	15.9	±	4.4	16.8	±	4.4	
small HDL	11.8	±	3.1	11.2	±	3.7	
very small HDL	4.6	±	1.2	4.3	±	1.0	

*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$

(Okazaki et al, Clin Chem, 2006;52:204-2053)

心疾患の有無による、小型LDL等サブクラスの脂質プロファイルの違いが明らかに

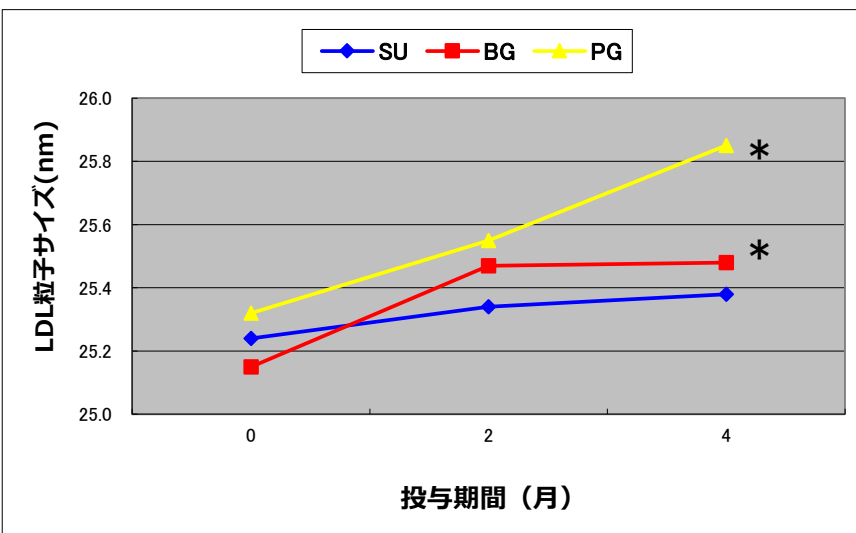
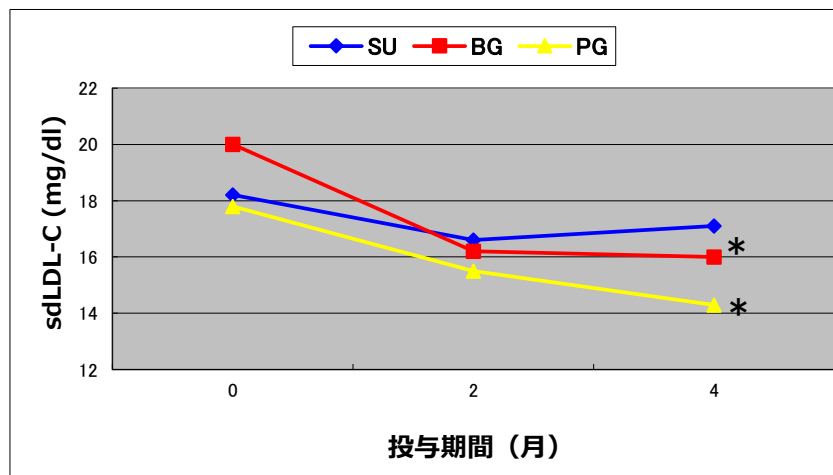
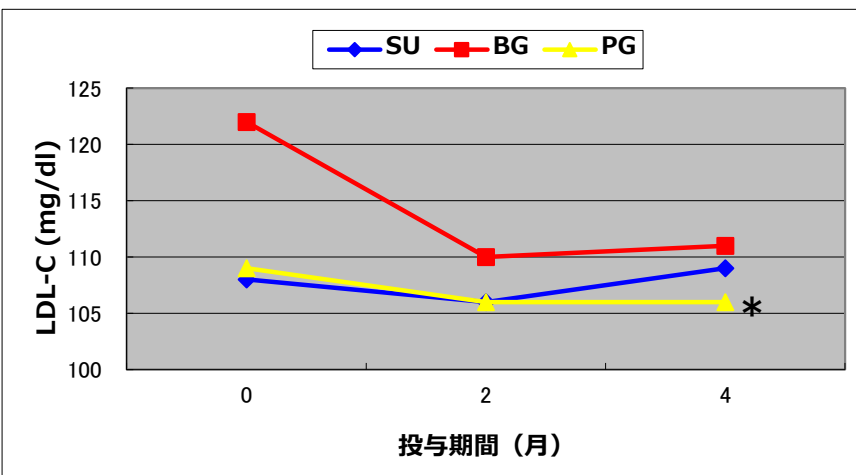
LipoSEARCH® が掲載された学術論文の中で、食品研究での活用事例 (用途)

- ・食品機能性のスクリーニング、作用メカニズムの解明
- ・開発品の差別化
- ・特産品に付加価値を見出す研究開発

食品素材	報告された作用	検体種	論文タイトル	概要
カシスエキス	総Cho ↓ VLDL-C ↓	ヒト	Hypocholesterolemic Effect of Blackcurrant (Ribes nigrum) Extract in Healthy Female Subjects: A Pilot Study <i>Molecules</i> . 2021 Jul 4;26(13):4085. Naoki Nanashima et al	摂取後29日で健常女性の血清総Choを有意に低下させた。LDL-Cの低下傾向およびVLDL-C値の有意な低下、小型VLDL-Cおよび大型LDL-Cの有意な低下も確認された。
秋田蓼エキス	総TG ↓ CM-TG ↓ VLDL-TG ↓	ヒト大腸癌細胞株 Caco-2 ヒト肝癌細胞HepG2 マウス	Anti-dyslipidemic effects of water extract from the leaves of Petasites japonicus subsp. giganteus (Akitabuki) <i>Journal of Biological Macromolecules</i> 2021 Volume 21 Issue 1 Pages 33-44 Gen Toshima et al	Caco-2、HepG2細胞にてアシル基転移に関与するMGAT2、DGAT2、リポタンパク質合成に必要なMTTP、ApoB100の発現を抑制した。また、リポタンパク質の産生を抑制した。 高脂肪食負荷マウスにて血漿総TG、CM-TG、VLDL-TGの増加を抑えた。
D-アルロース (希少糖)	LDL/HDL比 ↓	ハムスター	Dietary d-allulose alters cholesterol metabolism in Golden Syrian hamsters partly by reducing serum PCSK9 levels <i>Journal of Functional Foods</i> Volume 60, September 2019, 103429 Akane Kanasaki et al	食事性D-アルロースは、通常食給餌ハムスターのHDL-Cを有意に増加させた。また、高脂肪食給餌ハムスターのLDL-Cを低下させた。これによって両給餌群のLDL/HDL比が有意に低下した。また、両給餌群の血清PCSK9濃度も有意に低下した。
魚油 亜麻仁油	総TG ↓ 総Cho ↓ LDL-C ↓ HDL-C ↑	ラット	A comparison of the effects of fish oil and flaxseed oil on cardiac allograft chronic rejection in rats <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> . 2008 Mar;294(3):H1452-8. Rgia A Othman et al	ラット心臓同種移植片モデルにおいて、魚油の摂取により血漿総TG、総Cho、およびLDL-Cが有意に低下した。 また、亜麻仁油の摂取により血漿HDL-Cが有意に増加した。

解析事例：薬剤介入臨床研究－1

- (概要)
- ・ 糖尿病患者62例でSU剤、BG剤、PG剤の3群に分類し薬物治療を実施
 - ・ 開始前、2ヵ月後、4ヵ月後でLDL関連項目の変化を調べた



(結果)

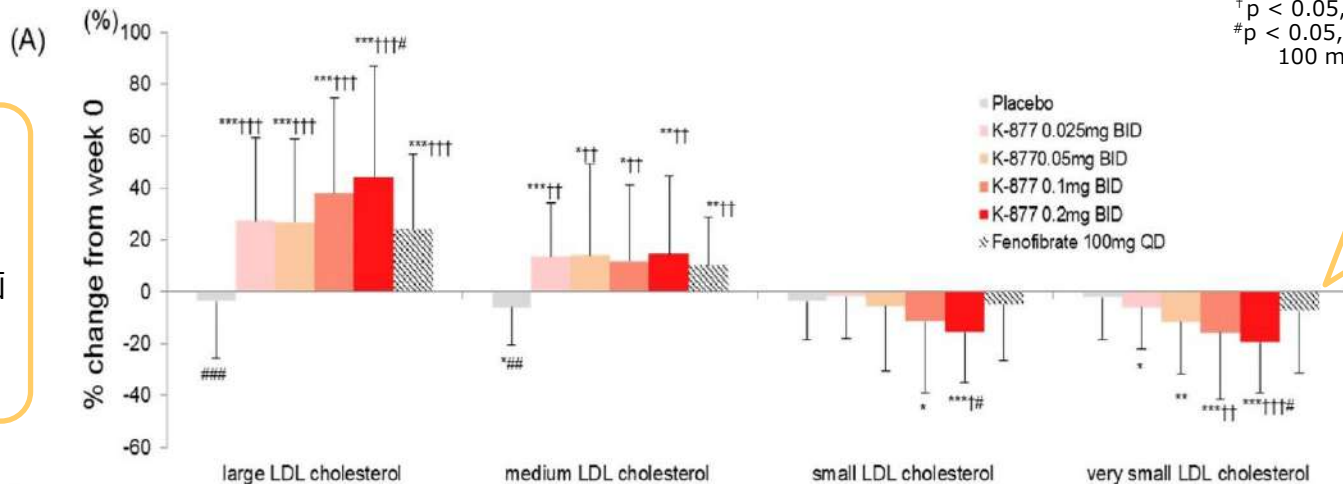
- ・ 血糖降下作用のみならず、小型LDL-Cの改善作用を示した
- ・ さらに、LDL粒子サイズも大幅な改善を示した
- ・ 特にPG剤（ピオグリタゾン）が小型LDLを顕著に改善した

**LipoSEARCHによるサブクラス解析で、
従来指標（=LDL-C）では把握できない
薬効の判明につながる可能性が示唆された。**

解析事例：ペマフィブラート製剤投与による LDL, HDLサブクラス分画への影響

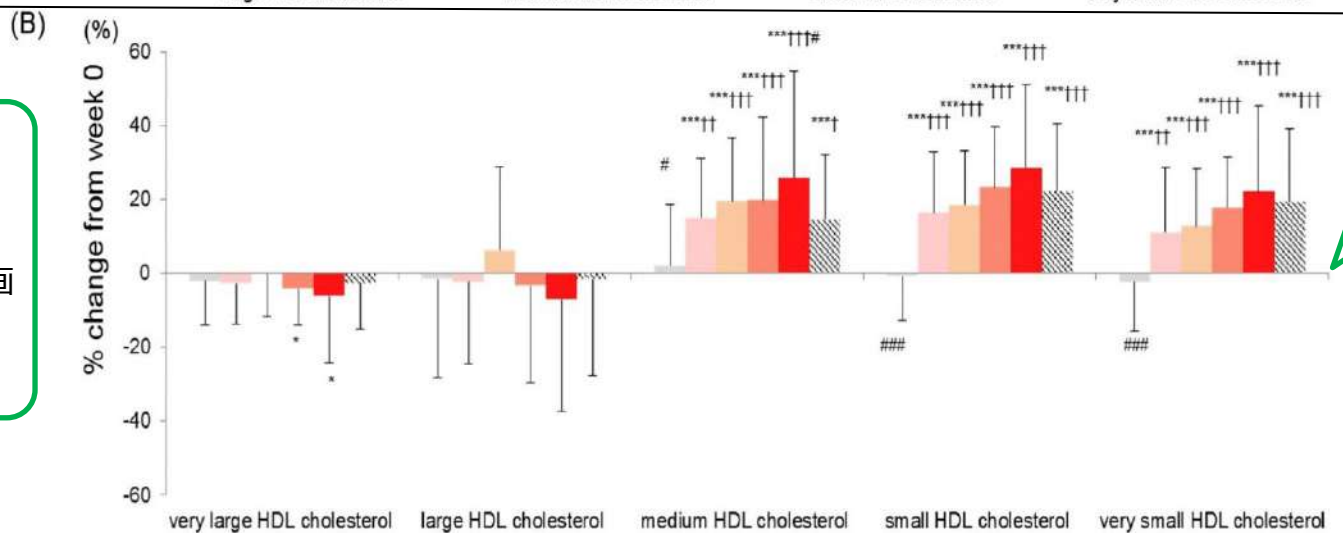
Mean. Error bars represent standard deviation (SD).
 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs Week 0
 †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 vs Placebo
 #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs Fenofibrate
 100 mg/day

LDL
詳細分画



用量依存的に、
動脈硬化惹起
性の高い
小型LDL-Cho
値を改善した。

HDL
詳細分画



用量依存的に、
中型～小型
HDL-Cho値を
改善した。

Effects of K-877, a novel selective PPAR α modulator (SPPARMa), in dyslipidaemic patients: A randomized, double blind, active- and placebo-controlled, phase 2 trial *Atherosclerosis* Volume 249, Pages 36-43 (June 2016)

No.	Questions	Answers
1	他の測定方法のデータと相関性はあるのですか？	超遠心法と相関性があることを確認しております。 (日本分析化学会「ぶんせき：2000,12」)
2	採取サンプルの送付までの保存はどのようにしたらよいですか？凍結してもよいですか？	サンプルは採取後4℃冷蔵保存をお願い致します。採取から測定まで1週間以内を目安としています。 凍結サンプルも測定可能ですが凍結融解を繰り返すと数値に影響が出ます。
3	採取したサンプルが溶血していた場合、測定値における影響はどのようになりますか？	溶血の場合は波形データの「HDLより後ろ～FGの前」にピークが現れます。 数値計算において、その部分は含みませんので、ほぼ影響はありません。
4	サンプル採取前の実験動物への給餌については、どのようにするのがよいのでしょうか？	食餌による影響をなるべく無くしたい場合には、採血前6時間程度絶食させるのが好ましいです。食餌による影響も考慮される場合には、通常通りに飼育頂いて構いません。
5	再現性、CV値、その他検証データはありますか？	データは各種取り揃えておりますので、ご希望があればお問い合わせ下さい。
6	検体は測定後に保管・返却してもらえますか？	検体の保管や返却は原則行っておりませんので、予めご了承下さい。
7	解析結果報告はどのような形式になりますか？	数値データ、波形データをエクセルファイルにまとめ、E-mailにて電子データでご報告差し上げます。
8	サービスの実績について教えてください。	国内外の国公立大学・公的研究機関から製薬企業・食品メーカーまで幅広い方々にお使い頂いております。また、LipoSEARCHにより取得したデータは、インパクト・ファクターの高いジャーナルで多数採用されております。
9	信頼性保証基準で申請用データを取得することは可能でしょうか？	はい。新薬の治験（Phase II、III）や非臨床試験、トクホ等で信頼性保証データ取得の実績が多数ございます。お気軽にご相談下さい。

■ ご用意頂くサンプルの種類、量

- 血清または血漿
- ヒトサンプルの場合は**45 μ l 以上**、動物サンプルの場合は**35 μ l 以上**

■ 注意事項

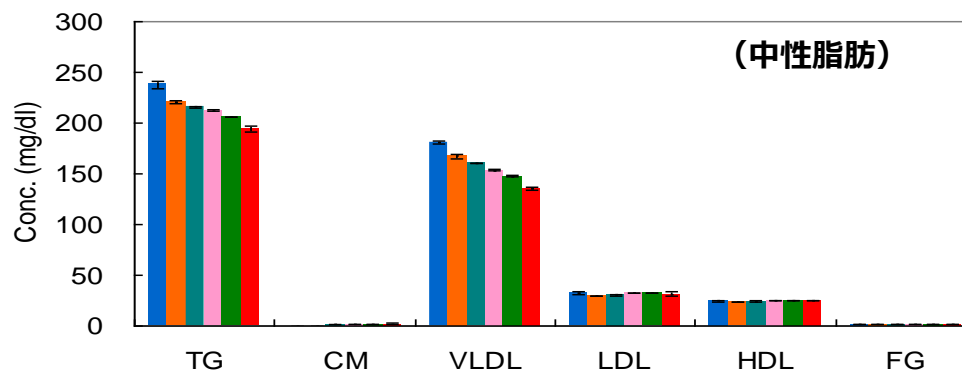
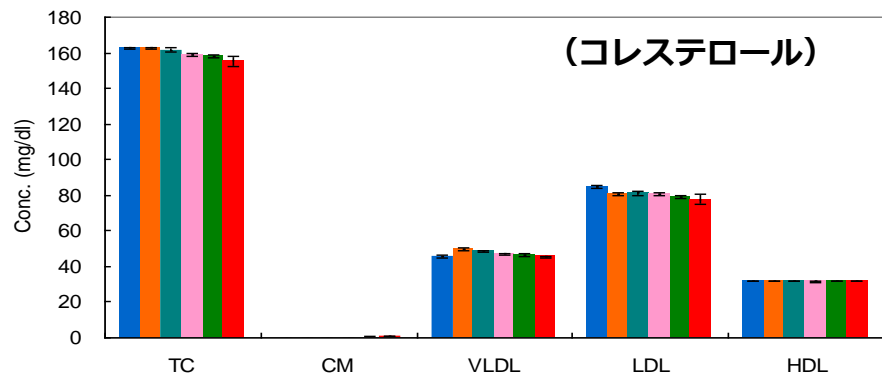
- 採血後 **4℃冷蔵にて1週間以内、または凍結**にてご発送下さい。
- 凍結融解を繰り返したサンプル、または長期間凍結保管したあるサンプルでの解析をご希望される場合は、事前にお問合せ下さい。
- 抗凝固剤にヘパリンを使用している場合は、事前にご相談下さい。
- サンプル量が上記より少量の場合には、希釈により測定できる場合もございますので、事前にお問い合わせ下さい。
- サンプルの保管・返却は行っておりませんので、ご了承下さい。
- 送料・梱包資材は、お客さま負担とさせて頂いておりますので、ご了承下さい。
- 病原性を有すると思われるサンプルの場合、事前に当社担当までご連絡下さい。

サンプルの送付先 (**依頼書**を同梱して下さい)

〒011-0911 秋田市飯島字砂田100-4 (株)免疫生物研究所 秋田解析センター
TEL 018-880-5060

※ サンプル受取日: **祝日、年末・年始を除く平日**
土曜・日曜・祝日は受取が出来ませんので予めご了承下さい

■凍結融解繰り返しによる検体への影響 (ヒト血清検体・各3回測定)



# of times	TC	s.d.	CM	s.d.	VLDL	s.d.	LDL	s.d.	HDL	s.d.
0	163	0.64	0.01	0.00	45.8	0.93	84.8	1.06	32.0	0.12
1	163	0.47	0.07	0.01	49.8	0.77	80.7	0.78	31.9	0.19
2	162	1.16	0.15	0.01	48.6	0.64	81.1	1.17	31.8	0.24
3	159	0.83	0.27	0.01	46.9	0.28	80.5	0.74	31.5	0.29
4	158	0.83	0.40	0.02	46.5	0.51	79.3	0.74	31.6	0.08
5	155	2.80	0.55	0.01	45.3	0.35	77.6	3.10	31.7	0.08

# of times	TG	s.d.	CM	s.d.	VLDL	s.d.	LDL	s.d.	HDL	s.d.
0	238	3.57	0	0.18	181	2.03	33	1.44	24	0.56
1	220	1.9	0.4	0.16	167.0	1.66	29.4	0.50	23.6	0.27
2	216	0.8	0.8	0.08	160.4	0.37	30.3	0.54	24.2	0.14
3	212	1.1	1.1	0.17	153.6	0.91	32.3	0.31	25.1	0.29
4	206	0.4	1.6	0.26	147.5	0.98	32.2	0.27	24.8	0.46
5	194	3.4	2.1	0.15	135.4	0.92	31.4	1.77	25.1	0.63

■サンプル梱包例



1.保冷剤(凍結サンプルの場合
はドライアイス)と接触しない
ように緩衝材などを間におい
て下さい。



2.中蓋をして、その上にも保冷
剤(凍結サンプルの場合はドラ
イアイス)をおいて下さい。



3.さらに緩衝材を上において
下さい。



4.蓋をして梱包は完了です。

会社名 : 株式会社免疫生物研究所
部署名 : 営業部
住所 : 〒375-0005
群馬県藤岡市中字東田1091-1

電話 : 0274-50-8666
E-mail : do-lipo@ibl-japan.co.jp

URL :
Service <http://www.lipo-search.com>
Corporate <https://www.ibl-japan.co.jp/>

